



TITLE:

2 サル肝ミクロソームのアルコール酸化酵素遺伝子cDNAクローニング及び機能解析(X.共同利用研究 2.研究成果)

AUTHOR(S):

渡辺, 和人; 舟橋, 達也; 山折, 大

CITATION:

渡辺, 和人 ...[et al]. 2 サル肝ミクロソームのアルコール酸化酵素遺伝子cDNAクローニング及び機能解析(X.共同利用研究 2.研究成果). 霊長類研究所年報 2005, 35: 102-103

ISSUE DATE:

2005-08-31

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/166138>

RIGHT:

次元核内配置について、3D-FISH 法により種間比較を通じて相対核内配置を明らかにするとともに、系統関係の詳細が未知な一部の種においてミトコンドリア DNA の分子系統解析を並行して行い、両者を統合した視点から霊長類の核型進化・系統進化を考察することを目的としている。特に近縁種間で進化的な染色体転座が生じている場合、対応する染色体領域の 3 次元核内配置からみた転座染色体の生成機構は興味深い。本年度は各種末梢血リンパ球より 3 次元核構造を維持した細胞核 3D スライドを作成し、ヒト 2 番染色体の短腕および長腕特異的ペインティングプローブを使用した 3D-FISH 法により、蛍光シグナルの検出条件、共焦点レーザースキャン顕微鏡による画像取得条件の検討を行った。FITC、Cy3 を 2 種類のプローブ、Cy5 を DNA 対比染色 (TOPRO-3) に対応させ、ニホンザル細胞核においても十分検出可能な蛍光強度を得る条件を確立した。現在、この条件で解析対象を各種へ拡大している。

(2) 施設利用

1 シセンキンシコウの社会構造の仮説

和田一雄

2001 年から 2004 年まで秦嶺山系で、キンシコウ西梁群を餌付けして、個体識別に基づき社会行動を観察し、社会構造の推定を行った。観察時期は主に 10-12 月と 3-4 月であった。前者には交尾期が含まれ、後者は出産期であった。毎日餌場に出てきた群れ内の社会単位、One Male Unit(OMU)はそれぞれの観察期間中は安定して同じ個体からなるものであった。それぞれの OMU は 1 頭の♂、複数♀、アカンボ・1~4 才の♂・♀を含む。交尾と grooming の大部分は OMU 内で行われていた。時期によって 5~9 個の OMU、個体数として 60-90 頭が餌場に出現した。これらの OMU は相対的に独立しているが、移動・採食・休息は同時に行うので 1 つの単位であり、band と呼ぶ。♂は 4 才になると OMU から消える。♂だけの集まりを見ているので、これを all male group とした。西梁群と初めによんだ集団はこの様に one male unit, band, all male group からなり、これらを含む全体を herd と呼ぶことにした。

4 年間で OMU の♂の交代が 2 回行われたが、♀はそのままであった。band から♀は成獣 5 頭、亜成獣 2 頭消え、新しい成獣♀が 5 頭入ってきた。また 9 つの OMU が消え、7 つの OMU が新しく入ってきた。同じ OMU の出入りは 3 回観察された。このような OMU の移動はもう一つの band の存在を暗示するのであるが、まだ直接的な証拠を持っていない。♂・♀の出入りから band は双系である可能性が高い。

2 サル肝ミクロソームのアルコール酸化酵素遺伝子 cDNA クローニング及び機能解析

渡辺和人、舟橋達也、山折大 (北陸大・薬・衛生化学)

我々はニホンザル肝臓より大麻成分 Δ^8 -tetrahydrocannabinol(Δ^8 -THC)の主代謝物の 1 つである 7-hydroxy- Δ^8 -THC から活性代謝物である 7-oxo- Δ^8 -THC への酸化を触媒するミクロソーム酵素 (Microsomal Alcohol Oxygenase, MALCO)を精製し、その MALCO 本体が CYP3A 分子種であることを明らかにしてきた。さらに、精製酵素の N 末端アミノ酸配列はカニクイザル CYP3A8 と同一であった。本年度の研究ではニホンザル (雄・3 才) 肝臓より mRNA を抽出し、CYP3A8 cDNA 等の非翻訳領域を基に設定したプライマーを用いて RT-PCR 法により cDNA をクローニングした。その塩基配列を決定したところ、カニクイザル

CYP3A8 と 4 塩基, 1 アミノ酸(S420N)残基の相違が認められた。クローニングした cDNA はリポフェクション法によりチャイニーズハムスター肺細胞由来 V79 に導入し, ニホンザル CYP3A8 安定発現系の構築を試みた。得られた発現系の培養液中に CYP3A の代表的な基質であるテストステロンを 100 μ M となるように添加し, 24-72 時間後の培養液中の代謝物を GC-MS により測定した。ベクターのみの系ではアンドロステノジオン生成だけが検出されたのに対し, 発現系ではテストステロンの 6 β 水酸化体生成も検出された。現在, 7-oxo- Δ^8 -THC 生成活性について検討している。

4 チンパンジーの繁殖特性に地域個体群変異をもたらす要因の検討

藤田志歩, 坪田敏男 (岐阜大・農)

野生チンパンジーでは, 性成熟年齢や出産間隔などの繁殖パラメータが地域個体群によって異なることが報告されている。本研究は, チンパンジーの繁殖特性に影響を及ぼす環境要因とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。生息地の異なる野生チンパンジーの活動および卵巣機能を比較するため, ギニア・ボッソウ村周辺およびタンザニア・マハレ山塊国立公園において, それぞれ約 80 日間のフィールド調査を行った。それぞれのチンパンジー地域個体群から月経周期の回っているメス各 4 個体を対象とし, 終日個体追跡により活動時間配分および採食品目を記録した。同時に, GPS を用いて対象個体の土地利用および移動距離を記録した。また, 生殖関連ホルモンの動態から卵巣機能をモニタリングするため, 資料となる糞および尿を採集した。今後, これらのデータを分析し, 地域個体群間で比較することにより, 生息環境とチンパンジーの活動あるいは栄養状態との関連について検討する。さらに, チンパンジーの活動あるいは栄養状態と卵巣機能との関連について検討する。また, 今回得た雨季のデータとこれまでに得た乾季のデータとを併せることにより, 季節変動を考慮した地域個体群間の違いについても検討する。

5 ニホンザルゲノム BAC ライブラリーの構築

斎藤成也 (国立遺伝学研究所・集団遺伝)

藤山秋佐夫国立情報学研究所教授と共同で, ニホンザルの BAC ライブラリーを作成した。景山節教授の協力により, 霊長類研究所で飼育維持しているオスのニホンザル 1 頭から 2002 年度に血液を採取した。これをもとに, BAC ライブラリーの作成を行った。2004 年

度までに, 19 万余個の BAC クローンを 384 穴プレート 500 余枚に整列した。これは 1 クローンの平均長を 100kb とすると, ニホンザルゲノムの 6 倍以上をカバーしたことになる。この作成作業は, 文部科学省の科学研究費補助金特定研究「統合ゲノム」の援助を得た。このニホンザルゲノム BAC ライブラリーは, 霊長類の比較ゲノム研究にとって重要なリソースになることが期待される。

6 野生のニホンザルの植物性食餌中の脂質, 殊に脂肪酸の組成について

小山吉人 (名古屋文理短期大)

野生のニホンザルが採食する植物系試料を若芽, 緑葉, 花卉, 果実, 果肉, 種子別に, また若干の季節別採集物も含めて, 60 試料を愛知県下で採集し, 脂質の脂肪酸組成を検討した。各乾燥試料は有機溶剤による二段階の抽出を行ってから, 定法により混合脂肪酸メチルを調製し, キャピラリーカラム (J&W:DB-23) により昇温ガスクロマトグラフィーを実施した。

葉の脂質は他の部位に比べてリノレン酸量が多かったが, 概ね 5~6 月にこの酸量の最大値が見られた。低級飽和脂肪酸が血中コレステロールを上昇させるとの報告があるが, 試料中のラウリン酸・ミリスチン酸などの含有量は 1%以下であった。一般に種子の飽和酸, 多価不飽和酸 (PUF) 量が共に低いのに対して, 若芽, 緑葉, 花卉の PUF が高含量であり, PUF の中では緑葉のリノレン酸量がそれぞれの種子と比べて 10 倍も高かった。

季節により葉や種実への依存度は異なるけれども, 野生のサルは生合成できない PUF を, このような食餌から摂取しているようである。

7 クモザルゲノムライブラリーからのマイクロサテライトの探索

平松千尋 (東京大・院・新領域)

チュウベイクモザル (*Ateles geoffroyi*) 1 個体由来のゲノム DNA を本共同利用研究により竹中修教授から分与いただいた。ゲノムライブラリー作成に先立ち, 他の新世界ザルのマイクロサテライト解析に有効であることが報告されている座位のクモザルにおける有効性を検討することとした。これまでにウーリーモンキーで同定されたいくつかのマイクロサテライト座位 (Di Fiore et al. 2004, Mol. Ecol. Notes 4:246-249) についてクモザルでの PCR 増幅と多型性を検討したが, まだ最適な増幅条件が得られておらず, 今後さらに他の座